

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 03-076595

(43)Date of publication of application : 02.04.1991

(51)Int.Cl.

C12P 21/00
// C12N 15/72
(C12P 21/00
C12R 1:19)

(21)Application number : 02-202616

(71)Applicant : BEHRINGWERKE AG

(22)Date of filing : 01.08.1990

(72)Inventor : GROTE MATHIAS DR

(30)Priority

Priority number : 89 3925550 Priority date : 02.08.1989 Priority country : DE

(54) OPTIMIZED FERMENTATION PROCESSES FOR PRODUCTION OF EXTRANEIOUS PROTEIN IN ESCHERICHIA COLI

(57)Abstract:

PURPOSE: To enable the increase in yield percentage and the yielding amount by maintaining oxygen partial pressure at a level exceeding more than 10%, when a lactose promoter is used and the fermentation is induced with IPTG or the lactose or with both of them.

CONSTITUTION: After an initial proliferation phase in which a lactose promoter or a modified lactose promoter is used and glucose is employed as a carbon source, the glucose or lactose concentration is controlled so that oxygen partial pressure may become higher than 10% or equal thereto, when the induction of product formation is done by isopropyl thiogalactoside (IPTG) under the glucose limitation or by lactose or by IPTG and lactose under lactose limitation, thereby optimizing the fermentation process for expressing the extraneous protein in gene-recombinant Escherichia coli K12 strain. Then, the fermentation is stopped, the cell bodies are concentrated in a known manner and disintegrated with a high-pressure homogenizer whereby the products are included in the clear supernatant.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

Concise Summary of
Japanese Patent No. 2977241

Disclosed is an optimized fermentation method (conditions) for producing foreign proteins, specifically lipocortine-related proteins in *E. coli* under the control of an inducible lac-promoter. The inventor found a novel method in which volumetric yield of the product can be increased by factor of 5 compared with conventional methods by controlling the time and amount of glucose (lactose) addition through which the oxygen partial pressure in the culture medium is maintained at least 10% (i.e. glucose limitation). The yield can further be improved by increasing the oxygen pressure using at least one of the means selected from the followings:

(a) fermentation under up to 2 bar overpress, (b) increasing the stirring rate and the aeration rate up to 2 vpm, and (c) lowering the temperature from 37 to 30 degree C. The advantage of this method is that it does not require particular equipment for aeration of highly pure oxygen and prevention of explosion of the oxygen.

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 特 許 公 報 (B 2)

(11) 特許番号

第2977241号

(45) 発行日 平成11年(1999)11月15日

(24) 登録日 平成11年(1999) 9月10日

(51) Int.Cl. ⁸	識別記号	F I	
C 1 2 P 21/00		C 1 2 P 21/00	C
// C 1 2 N 1/20		C 1 2 N 1/20	A
15/09		15/00	A
(C 1 2 P 21/00			
C 1 2 R 1:19)			

請求項の数 6 (全 5 頁)

(21) 出願番号	特願平2-202616	(73) 特許権者	999999999
(22) 出願日	平成2年(1990)8月1日		ヘキスト・アクチエンゲゼルシャフト ドイツ連邦共和国フランクフルト・ア ム・マイン (番地なし)
(65) 公開番号	特開平3-76595	(72) 発明者	マテイーアス・グローテ
(43) 公開日	平成3年(1991)4月2日		ドイツ連邦共和国デー・3550 マルブル ク、グラデンバヘルヴェーク65
審査請求日	平成9年(1997)6月19日	(74) 代理人	弁理士 高木 千嘉 (外2名)
(31) 優先権主張番号	P 3 9 2 5 5 5 0 . 6		
(32) 優先日	1989年8月2日	審査官	新見 浩一
(33) 優先権主張国	ドイツ (DE)	(58) 調査した分野(Int.Cl. ⁸ , DB名)	
			C12P 21/00 - 21/02 C12N 15/00 - 15/90 B I O S I S (D I A L O G) W P I (D I A L O G) E P A T (Q U E S T E L)

(54) 【発明の名称】 大腸菌中での外来性タンパク製造のための最適化発酵法

1

(57) 【特許請求の範囲】

【請求項1】 ラクトースによって誘導可能なプロモーターを使用する大腸菌中での外来性タンパクの製法であって、IPTGによる誘導及び炭素源としてグルコースを用いる場合に、酸素分圧が10%より大きい又はそれに等しくなるようにグルコース濃度をコントロールすることを特徴とする上記の方法。

【請求項2】 ラクトースによって誘導可能なプロモーターを使用する大腸菌中外来性タンパクの製法であって、炭素源及び天然誘導因子としてラクトースが使用される場合に、酸素分圧が10%より大きい又はそれに等しくなるようにラクトース濃度をコントロールすることを特徴とする方法。

【請求項3】 ラクトースによって誘導可能なプロモーターを使用する大腸菌中外来性タンパクの製法であって、

2

炭素源及び天然誘導因子としてラクトースが使用され、更に誘導因子としてIPTGが使用される場合に、酸素分圧が10%より大きい又はそれに等しくなるようにラクトース濃度をコントロールすることを特徴とする方法。

【請求項4】 次の方法の構成要素の少なくとも1つが適用される請求項1、2又は3記載の方法。

(a) 好ましくは2バールまでの、超大気圧下の発酵、
(b) 入力 (攪拌速度は増大させること) 及び通気速度 (2vvmまで) のコントロールされた追跡、

(c) 温度を37℃から30℃のような温度まで低下させること、

(d) 最大値5~10g/ℓまでの炭素源としての基質のコントロールされた添加、

(e) pH6.7~pH7.3の値にpHをコントロールすること。

【請求項5】 リポカルチンのcDNAを含有する大腸菌株を

発酵させる請求項1、2、3又は4記載の方法。

【請求項6】cDNAがPP4、PP4-x又はPP4の突然変異体及び変異体をコードする請求項5記載の方法。

【発明の詳細な説明】

本発明は、lacプロモーター又は改良lacプロモーター（例えばlac、lrc）を使用して大腸菌中外来性タンパクを製造するための最適化発酵法を記述する。炭素源としてグルコースを用いる初期増殖相の後、（1）グルコース制限下IPTGによるか又は（2）ラクトースによるか又は（3）ラクトース制限下IPTG及びラクトースにより生成物形成の誘導が行われる。グルコース又はラクトースの制限は、酸素分圧が10%を超えて保たれるようにする。

大腸菌中多種の遺伝子組替タンパクを商業的な量製造することは原理的に周知である。これらのタンパクの発現は、適当な配列をもつマルチコピイプラスミド中にコードするcDNAをクローンすることによって可能となる。

このことについての発現実験は、普通振盪フラスコ中実施される。この場合遺伝子組替タンパクの収量は、100ml未満の容量をもつ振盪フラスコ中の培養が用いられるとき普通50〜100mg/ℓである。

これらの技術を用いて遺伝子組替タンパクの製造に成功することは可能であるが、タンパク濃度及び製造可能な量を明らかに増大させる技術の必要性がある。これらの要件に適合する1つの試みが発酵法の開発である。従って本発明の目的は、大腸菌中外来性タンパクの発現のための発酵法の最適化である。

該要件が少なくとも部分的には満足されているいくつかのこのような方法が文献に記載されている。これらの場合lacプロモーターを使用することは、通常N-末端β-ガラクトシダーゼタンパク（β-Gal）をもつ融合タンパクが製造されたことを意味している。この発酵における収量は普通リットルあたり融合タンパク0.1〜2.0gである。融合型β-Galタンパクを考えるとときには、実際の生成物濃度は、該値の30%に低下することが多い。更に、生成物からβ-Galタンパクを除去するため綿密な精製処理を要する。

本発明は、なかんずく、成熟した生成物の発現、即ち後に再び除かなければならない融合生成物のない生成物の発現を記述する。このような方法によって生成物の精製が比較的単純に行われる。しかし、発酵プロセス中生成物の特有及び容量収量（specific and volumetric yields）は普通かなり低い。この方法の生成物が可溶性かつ生物学的に完全に活性な形態で製造されるときこのことが特にあてはまる。不活性でありかつ封入体として貯えられるタンパクの生成と異なり、可溶性かつ生物学的に活性な生成物は、細胞の代謝に介入し、生物（大腸菌）中激しい妨害を生じることがあり、又大腸菌プロテアーゼによってかなり容易に分解されることがある。これらの問題にもかかわらず、炭素源としてグルコースが用い

られ、イソプロピルチオガラクトシド（IPTG）が誘導のために使用された今日までの方法において生物学的に完全に活性な生成物の200mg/ℓの収量を得ることが可能であった。

発酵を最適化するために、本発明は増殖挙動及び生成物形成の改善を課題とした。生成物は細胞の内部に形成されるので、生成物の比濃度（specific product concentration）（細胞あたり生成物の量）及び細胞数が重要である。この2つの因子の積がリットルあたりグラム（g/ℓ）の方法の容量生産法である。

高細胞密度発酵は、遺伝子組替大腸菌株についてしばしば文献に記載されている。リットル（ℓ）あたり乾燥物（DM）30gまでの細胞密度がこれに関連して述べられている。原理的に知られているいくつかの手段の組合せにより、遺伝子組替大腸菌K12株を150A₅₅₀に対応する50gのDM/ℓの細胞密度まで発酵させる方法を開発することが可能となっている。本発明において本質的な点は、取入れ空気の酸素強化が後述される方法の1条件ではないことである。基質としての純酸素は高いコストを生じ、その上、爆発防止手段を省くことが可能であるので、このことは方法の経済性に有利な効果を有する。

高い用量生成物収量をもつ方法について重要な因子は、プロモーターの最適誘導である。IPTGによる誘導は、前述した低細胞密度の場合に実施されており、文献に多数記載されている。IPTG（1mM〜10mM、好ましくは5mM）による誘導及び酸素分圧が10%より大きいか又はそれに等しくなるような基質としてグルコースの制限の後因数5、0.2g/ℓから1.0g/ℓまでの容量収量の改善が達成されることが見出された。

本発明の第2の実施態様は、炭素源及び同時に天然インデューサーとしてラクトースを用いる増殖の場合の生成物形成の誘導よりなる。酸素分圧は、ラクトースの添加をコントロールすることによって上と同様に10%より大きいか又はそれに等しい水準に保たれた。ラクトースによる誘導は、この操作がIPTG誘導より効率が低いといわれているので、文献において最適に至らないと見なされている。現在まで、ラクトースをインデューサーとして用いる効率のよい発酵法は記載されていない。本発明による実験の試みは、おそい生成物の形成の方が大腸菌の固有の代謝に対して小さい妨害効果を有しているの、弱い誘導、即ちおそい生成物の形成の方が生成物の高い最終濃度を達成することができるという考察に基づいている。この試みは、上に比して2倍に相当する2g/ℓ（+/-10%）の生成物濃度が達成された適当な実験において確かめられている。増殖の直線期においてグルコースがラクトースに置き換えられた点で、この方法はIPTGによって誘導される以前の方法と異なっている。発酵の終末における高い代謝活性の範囲内では、10%を超える酸素の分圧を達成するためにラクトースの添加も制限されたとき、この方法の第3の変法においてラクトー

スによる誘導を更にIPTG添加によって助けることが可能であった。この追加のIPTG誘導は、特定の選ばれた発酵装置の入力が培養物に酸素を供給するのに不十分であるときにのみ必要である。上述した第2の方法においてプラスミド損失の増大が観察されるので、スケールアップの際には発酵容量が増大するに従って交差する点があり、ラクトースによる誘導の際プラスミド損失のわずかな増大が観察されるので、その後最初は第2、次に第1の方法の方が経済的である。

生成物の濃度が最大になる時点で発酵を停止する。当業者に知られている処理を使用して生物体を濃縮（例えば分離器中）、崩壊（例えば高圧ホモジナイザー中）させる。細胞フラグメントの沈降の後では、生成物の大部分は透明になった上清中に含まれている。

従って、本発明は、lacプロモーター又は最適化lacプロモーターのコントロール下大腸菌中外来性遺伝子の発現のための最適化発酵法であって、

(1) IPTG、同時に基質制限されたグルコース添加、そしてグルコース添加の制限によって酸素分圧が10%を超えて保たれることによるか、

(2) 又は炭素源及び同時に天然インデューサーとしてラクトース、ラクトース添加の制限によって酸素分圧が10%を超えて保たれることによるか、

(3) 又は炭素源及び同時に天然インデューサーとしてラクトース、そして更にIPTG、ラクトース添加の制限によって酸素分圧が10%を超えて保たれることによって対数増殖期の終末において誘導が行われる方法に関する。

この方法の好ましい変法においては、各々の場合酸素分圧を次の手段のうち1つ又はそれ以上によって増大さ

せる：

(a) 好ましくは2バールまでの、超大気圧下の発酵
(b) 入力（攪拌速度を増大させること）及び通気速度（2vvmまでの）のコントロールされた追跡

(c) Henry係数の改善及び代謝活性の低下により、酸素移行速度を増大させかつ酸素取込み速度を低下させる（バッチの大きさ（=容器）が増大すると共に比入力（specific powerinput）が減少するので1,000ℓを超えるスケールアップの際必要）ために温度を37℃から30℃に至るまで低下させること。

炭素源として糖基質の添加が最大値5～10g/ℓにコントロールされること及び全発酵期間pHがpH6.7～pH7.3の範囲にNH₄OH及びH₃PO₄の添加によってコントロールされることは、この方法の変法のすべてに共通である。

上述した方法は、タンパクPP4及びPP4-x（これらはリボコルチンに属する（Grundmannら、Proc. Natl. Acad. Sci. 85（1985）3708～3712））、ならびにそれらの突然変異体（mutant）及び変異体（variant）の遺伝子工学的製造に好ましく用いられる。

本発明は、実施例及び特許請求の範囲において更に説明されている。

実施例

次の実施例は大腸菌K12株W3110 lac I^Q（Brent及びPtashne（1981）Proc. Acad. Natl. Sci. USA 78, 4204～4208）の発酵を記述するもので、この菌株は、プラスミドpTrc 99A-PP4（Amannら（1988）Gene 69, 301～315）又はpTrc 99A-PP4-x（Grundmannら（1988）Behring Inst. Mitt. 82, 59～67）を用いて形質変換されている。

表1は極めて適している培地を示す。

表 1

生育培地の1例の組成

(リットルあたりg又はmg単位のデータ)

炭素源(糖)必要に応じ

イーストエキス	20g
$\text{NaH}_2\text{PO}_4 \times \text{H}_2\text{O}$	1.2g
$\text{Na}_2\text{HPO}_4 \times 2\text{H}_2\text{O}$	8.5g
KCl	1.0g
$\text{MgSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2.0g
クエン酸	0.25g
NH_4Cl	5.0g
チアミン	5.0mg
H_3BO_3	2.0mg
$(\text{NH}_4)_6\text{Mo}_7\text{O}_{24} \times 4\text{H}_2\text{O}$	0.8mg
$\text{CuSO}_4 \times 5\text{H}_2\text{O}$	0.16mg
KI	0.4mg
$\text{MnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	2.02mg
$\text{ZnSO}_4 \times 7\text{H}_2\text{O}$	1.6mg

発酵は8ℓの発酵容量をもつ10ℓのBiostat Eファーマンター(製作者: Braun Melsungen)中実施された。

発酵の間プラスミド含有細胞に対して選択圧力はかけなかった。即ち発酵は抗生物質の添加なしに実施された。ファーマンターに一夜の振盪フラスコ前培養物を接種した。増殖の初期相において炭素源としてグルコースを用い、この相において0.1M未満の酢酸が生成するようにグルコースをはかり入れた。酢酸濃度が增大すると生成物の収量は有意に低下した。増殖の初期相中10~15時間後、約500D₆₀₀の細胞濃度が達成され、生成物形成の誘導は次の3つの異なった別の方式で行われた。

(1) 1~10mMのIPTG(好ましくは5mMのIPTG)の添加後グルコースのはかり入れを継続

増殖の初期相の終末において、炭素源としてグルコー

ス(「基質」)のはかり入れを継続しながら1~10mMのIPTG(好ましくは5mMのIPTG)を添加することによって生成物の形成を誘導した。この場合生成物形成の速度は、その時におけるグルコース濃度への明らかな依存性を示した。実際の基質としてグルコース及び外見上の基質としてIPTGは競合する基質と思われ、ジオキシシーの法則に従って、グルコースはlacオペロンの活性化を部分的又は完全に抑制した。この場合1g/ℓのPP4又はPP4-xの収量がグルコース制限系(0.1g/ℓ未満のグルコース濃度)において得られた。

グルコースの制限は、ポイントを設置することによるか又はオンラインHPLC測定を用いて実施された。細胞の増殖速度は、非制限系中誘導によって低下しなかったが、予期されたとおり制限系中グルコース濃度の関数と

して細胞の増殖速度が低下した。関連増殖速度によって、100～1500 $\times 10^3$ の細胞密度に達した。

(2) ラクトースのはかり入れを継続

初期増殖相の終末において、炭素源としてグルコースをラクトースに置き換えることによって生成物の形成を誘導した。ラクトースはlacオペロンの生理的誘導因子であるが、IPTGより小さい完全誘導をもたらす。この誘導相の間、細胞は1000 $\times 10^3$ の細胞密度になるまで増殖し続けた。生成物濃度は1.5g/lの値に達した。

(3) ラクトースのはかり入れ継続及び1～10mMのIPTG (好ましくは5mM) の添加

初期増殖相の終末において、炭素源としてグルコースをラクトースに置き換え、更にIPTGを添加することによ

って生成物の形成を誘導した。この場合には、IPTGによって強い誘導がもたらされ、同時に生理的基質ラクトースが利用される。グルコース+IPTGと異なり、この場合には炭素源の正確なはかり入れは不必要である。30g/lまでの過剰のラクトースは生産性に悪影響がない。この誘導の間細胞は同様に1000 $\times 10^3$ の細胞密度になるまで増殖し続けた。発酵の終末における生成物濃度は2.0g/lであった。

プラスミドの安定性は(1)から(3)まで低下するので、特定の発酵バッチサイズの間数としてこれらの方法の1つによって誘導が実施される。

上述した実験において選ばれた発酵パラメーターを表2に要約する。

表 2

発 酵 パ ラ メ ー タ ー

pH : 7.0 (H_3PO_4 及び NH_4OH の添加によってコントロール)

通気速度 : 0.5～2.0vvm

回 転 数 : 1,500rpm

温 度 : 37°C (30°Cまで)

ゲージ圧 : 2.0バールまで

基質濃度 : グルコース 5.0g/l未満にコントロール、溶存酸素が減少した時制限 ;
ラクトース 次のはかり入れにおいて(30g/l) 未満にコントロール、溶存酸素が減少した時制限。

溶存酸素 : 10%超過